

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2009

УДК 616.441-008.1-092:612.822.1]-07

Ф. Х. Иноятова<sup>1</sup>, А. К. Тонких<sup>2</sup>, Д. Т. Якубова<sup>1</sup>**ГАМК-РЕЦЕПТОРНЫЕ СИСТЕМЫ МОЗГА ПРИ ДИСФУНКЦИИ ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ**<sup>1</sup>Кафедра биоорганической и биологической химии Ташкентской медицинской академии; <sup>2</sup>Национальный университет им. М. Улугбека, Ташкент

*Исследовано влияние экспериментального гипо- и гипертиреоза на плотность <sup>3</sup>H-мусцимол- и <sup>3</sup>H-дiazepam-связывающих сайтов в синаптических мембранах из мозга крыс. Показано, что при гипотиреозе плотность <sup>3</sup>H-мусцимол и <sup>3</sup>H-дiazepam-связывающих сайтов повышена, а при гипертиреозе — понижена. Это может объяснять преобладание общего торможения животных при гипотиреозах и преобладание общего возбуждения при гипертиреозах.*

**Ключевые слова:** экспериментальный гипотиреоз, экспериментальный тиреотоксикоз, рецепторы ЦНС.

F.Kh. Inoyatova<sup>1</sup>, A.K. Tonkikh<sup>2</sup>, D.T. Yakubova<sup>1</sup>**BRAIN GABA-RECEPTOR SYSTEMS IN FUNCTIONAL THYROID DISORDERS**<sup>1</sup>Department of Bioorganic and Biological Chemistry, Tashkent Medical Academy; <sup>2</sup>M. Ulugbek National University, Tashkent

*This experimental study was designed to evaluate effects of hypo- and hyperthyroidism on the density of <sup>3</sup>H-muscimol and <sup>3</sup>H-diazepam-binding sites in synaptic membranes of the rat brain. It was shown that density of both <sup>3</sup>H-muscimol and <sup>3</sup>H-diazepam-binding sites increases in animals with hypothyroidism and decreases in hyperthyroidism. This difference may account for the predominance of general inhibitory reaction in animals with hypothyroidism and general excitation in hyperthyroid rats.*

**Key words:** experimental hypothyroidism, experimental hyperthyroidism, thyrotoxicosis, CNS receptors

Гормоны щитовидной железы играют ключевую роль в развитии и нормальной функции мозга у позвоночных животных. Еще в ранних клинических наблюдениях и экспериментах на животных было отмечено, что при гипертиреозах ослабляются все виды торможения в ЦНС, и прежде всего пресинаптическое торможение, а при гипотиреозах, наоборот, ослабляются процессы возбуждения.

Гамма-аминомасляная кислота (ГАМК) является основным тормозным нейромедиатором мозга. По данным радиоавтографии, от 20 до 40% всех синапсов мозга являются ГАМК-эргическими [6]. К настоящему времени получены убедительные доказательства о многостороннем взаимовлиянии тиреоидной и ГАМК-эргической регуляторных систем и основное действие тиреоидных гормонов на функции ЦНС опосредуется именно через тормозную ГАМК-эргическую передачу [15]. В экспериментах *in vivo* и *in vitro* на крысах и мышах получены данные, которые указывают, что тиреоидные гормоны действуют на различные компоненты ГАМК-эргической системы. Показано влияние тиреоидных гормонов на ферменты, ответственные за синтез и деградацию ГАМК, высвобождение ГАМК и ее обратный захват нервными клетками, экспрессию ГАМК-рецепторов генами и их постсинаптическую функцию [15].

У взрослых животных при гипотиреозе в основном увеличивается активность ферментов, синтези-

рующих ГАМК, и поэтому уровень ГАМК повышен. При гипертиреозе, наоборот, активность этих ферментов понижена, и уровень ГАМК снижен. Но, как показали исследования *in vitro*, этот эффект наблюдается не всегда, так как тиреоидные гормоны увеличивают высвобождение ГАМК из пресинаптических терминалей и подавляют обратный захват ГАМК, поэтому присутствие тиреоидных гормонов в синапсе может продлить действие ГАМК после ее высвобождения. Этот эффект тиреоидных гормонов опосредован через связывание их с цитоплазматическими и ядерными рецепторами [15].

Имеются и противоречивые данные о действии долговременных изменений в уровнях тиреоидных гормонов на обратный захват ГАМК. В экспериментах *in vivo* увеличение или уменьшение уровня тиреоидных гормонов изменяет плотность связывающих сайтов для ГАМК и бензодиазепинов в ГАМК<sub>A</sub>-рецепторах мозга, но результаты варьируют от исследования к исследованию, что может отражать важные региональные различия в мозге [15]. Имеются данные, полученные в экспериментах *in vitro*, что тиреоидные гормоны неконкурентно ингибируют ГАМК-стимулируемые хлорные токи через связывание с ядерными рецепторами, находящимися в цитоплазме [7].

В щитовидной железе, как и в ЦНС, выявлены ГАМК-транспортирующие системы и ферменты синтеза и деградации ГАМК, которые чувствительны к тиреоидным гормонам. Показано, что у крыс и людей, ГАМК ингибирует высвобождение из гипофиза тиреоидстимулирующего гормона. ГАМК также ингибирует стимулированное тиреотропным гормоном высвобождение тиреоидных гормонов из щитовидной железы. Таким образом, эти исследования доказывают, что имеется тесная взаимосвязь между тиреоидной и ГАМК-эргической регуляцией у позвоночных животных [15].

**Сведения об авторах**

Иноятова Феруза Хидоятовна, доктор биол. наук, проф. кафедры.

Тонких Анатолий Константинович, канд. мед. наук, науч. сотр. кафедры биофизики.

**Для контактов:**

Якубова Гильноза Турдалиевна, аспирант кафедры.

Адрес: 100109, Ташкент, ул. Фараби-2

e-mail: dilnoz1177@mail.ru



Представление о том, что основное действие тиреоидных гормонов на ЦНС опосредуется через тормозную ГАМК-эргическую передачу стало формироваться только в последние 2—3 года. Некоторые экспериментальные работы противоречат друг другу. В этой связи представляются актуальными проверка и уточнение данных разных авторов о влиянии тиреоидных гормонов на ГАМК-эргическую систему. Целью настоящей работы явилось изучение плотности мусцимол- и бензодиазепинсвязывающих участков в ГАМК<sub>A</sub>-рецепторном комплексе при экспериментальном гипо- и гипертиреозе.

## Материалы и методы

Эксперименты были проведены на 50 крысах обоего пола. Гипотиреоз воспроизводили введением ингибитора синтеза тироксина — мерказолила в суточной дозе 5 мг/кг в течение 2 мес внутрибрюшинно, ежедневно. Гипертиреоз воспроизводили также ежедневным внутрибрюшинным введением L-тироксина в дозе 100 мкг/кг в течение 2 мес. Данные модели являются классическими и широко применяются в экспериментальной медицине [1]. В работе использовались следующие приборы и реактивы: сахароза, трис-(оксиметил)-аминометан, соляная кислота "Реахим", "хч" (Россия), <sup>3</sup>H-мусцимол (15 Ки/ммоль), <sup>3</sup>H-диазепам (25 Ки/ммоль) фирмы "Amersham" (Англия); нитроцеллюлозные фильтры "Милипор" с размером пор 0,3—0,4 мкм, ПЛО (РРО) или 2,5-дифенилоксазол, ПОПОП (РОРО) или п-бис-2-(5-фенилоксазоил), толлуол сцинтилляционный.

Взрослых крыс массой тела 150—500 г забивали отсечением головы. Так как связывание мусцимола с ГАМК<sub>A</sub>-рецепторным комплексом сильно зависит от стресса животного, крыс перед отсечением головы около 5 мин держали в руках в перчатках и успокаивали. Голову отсекали ножницами, когда было видно, что крыса спокойна. Отдельно у самцов и самок брали кору, мозжечок и ствол мозга. Их отдельно размельчали ножницами в чашке Петри на льду и гомогенизировали в 10 объемах 0,32 М сахарозы в гомогенизаторе Поттера (стекло-тефлон). Гомогенат центрифугировали при 1000 g 10 мин. Супернатант центрифугировали при 20 000 g 30 мин. Полученный осадок (P<sub>2</sub>), представляющий грубую синапсомембранно-митохондриальную фракцию, замораживали-оттаивали и трижды отмывали от эндогенной ГАМК ресуспендированием-центрифугированием в холодной дистиллированной воде. Операция отмывания является обязательной, так как в тканях мозга содержится довольно много эндогенной ГАМК (2—4 мкг на 1 г ткани), что при гомогенизации мозга в 10 объемах среды может составить концентрацию около 10<sup>-4</sup> М.

Эксперименты по связыванию проводили, как описано в работе О. Chude [3]. Радиоактивность измеряли на счетчике β-2<sup>0</sup>.

## Результаты

По данным литературы [4, 8] основные постсинаптические ГАМК<sub>A</sub>-рецепторно-канальные ком-

плексы имеют на себе, в разной комбинации, связывающие сайты для различных лигандов: ГАМК, бензодиазепинов, барбитуратов, пикротоксина и ряда других модуляторов.

Для ГАМК-связывающего сайта обычно используют меченый мусцимол — алкалоид из гриба мухомора, который с более высоким сродством, чем ГАМК, связывается с ГАМК<sub>A</sub>-рецепторным комплексом и намного слабее связывается с другими типами ГАМК-рецепторов (ГАМК<sub>B</sub> и ГАМК<sub>C</sub>).

Кривая зависимости количества специфически связавшегося меченого <sup>3</sup>H-мусцимола от концентрации меченого <sup>3</sup>H-мусцимола с фракцией отмываемых синапсомембранных мембран из мозга крыс имеет сложный характер, который отражает существование в мозгу нескольких связывающих сайтов для ГАМК [2]. Анализ таких кривых сложен, но для целей настоящей работы нам достаточно изучать связывание с самым высокосродственным сайтом для ГАМК, K<sub>d</sub> (константа диссоциации) которого для мусцимола лежит в диапазоне 1—10 нМ. В последующих экспериментах плотность связывающих сайтов мы измеряли при концентрации меченого <sup>3</sup>H-мусцимола 10 нМ, при которой концентрация связывающих сайтов высокого сродства близка к максимальной.

В табл. 1 представлены результаты изучения плотности связывающих сайтов для мусцимола при гипотиреозе и гипертиреозе в различных областях мозга у самцов и самок крыс. Анализ данных показывает, что в коре и мозжечке интактных крыс имеется приблизительно одинаковая плотность ГАМК<sub>A</sub>-рецепторных комплексов, а в стволе мозга она в 2 раза ниже. Это в целом соответствует данным литературы [11]. Половых различий в плотности ГАМК<sub>A</sub>-рецепторов в мозге крыс не выявлено. Как видно из табл. 1, при гипотиреозе во всех изученных областях мозга у самцов и самок плотность ГАМК<sub>A</sub>-рецепторов повышена на 25—30%, а при гипертиреозе, наоборот, понижена на 30—50%.

Составной частью ГАМК<sub>A</sub>-рецепторных комплексов являются бензодиазепиновые рецепторы. В наших предварительных экспериментах было показано, что константы связывания <sup>3</sup>H-диазепама с

Таблица 1

Плотность <sup>3</sup>H-мусцимолсвязывающих сайтов в препаратах синапсомембранных мембран из различных областей мозга крыс

Крысы	Область мозга	Плотность связывающих сайтов (в пмоль на 1 мг белка)		
		при гипотиреозе	в контроле	при гипертиреозе
Самки	Кора	0,28 ± 0,03	0,19 ± 0,02	0,13 ± 0,01
	Мозжечок	0,27 ± 0,03	0,20 ± 0,02	0,15 ± 0,01
	Ствол	0,13 ± 0,01	0,09 ± 0,01	0,06 ± 0,01
Самцы	Кора	0,25 ± 0,03	0,17 ± 0,03	0,12 ± 0,01
	Мозжечок	0,29 ± 0,03	0,20 ± 0,03	0,15 ± 0,01
	Ствол	0,14 ± 0,01	0,08 ± 0,01	0,06 ± 0,01

Примечание. Концентрацию связывающих сайтов измеряли при концентрации меченого мусцимола 10 нМ. Представлены средние значения из трех экспериментов с 4-кратной повторностью в каждом ± стандартное отклонение; p ≥ 0,95.



Таблица 2

Плотность  $^3\text{H}$ -диазепамсвязывающих сайтов в препаратах синап-  
тосомальных мембран из различных областей мозга крыс

Крысы	Область мозга	Плотность связывающих сайтов (в пмоль на 1 мг белка)		
		при гипотиреозе	в контроле	при гипертиреозе
Самки	Кора	$0,44 \pm 0,04$	$0,30 \pm 0,04$	$0,22 \pm 0,03$
	Мозжечок	$0,47 \pm 0,05$	$0,31 \pm 0,04$	$0,25 \pm 0,03$
	Ствол	$0,23 \pm 0,02$	$0,15 \pm 0,02$	$0,11 \pm 0,01$
Самцы	Кора	$0,41 \pm 0,04$	$0,27 \pm 0,03$	$0,20 \pm 0,02$
	Мозжечок	$0,45 \pm 0,04$	$0,30 \pm 0,03$	$0,24 \pm 0,02$
	Ствол	$0,20 \pm 0,02$	$0,13 \pm 0,01$	$0,10 \pm 0,01$

Примечание. Концентрацию связывающих сайтов измеряли при концентрации меченого диазепама 10 нМ. Представлены средние значения из трех экспериментов с четырехкратной повторностью в каждом  $\pm$  среднее отклонение;  $p \geq 0,95$ .

препаратами синаптосомальных мембран из коры мозга крыс приблизительно равны:  $K_d \sim 4,6$  нМ и  $V_{\text{макс}} \sim 0,27$  пмоль на 1 мг белка. Эти результаты согласуются с данными литературы [9]. В последующих экспериментах плотность связывающих сайтов мы измеряли при концентрации меченого  $^3\text{H}$ -диазепама — 10 нМ, при которой концентрация связывающих сайтов близка к максимальной.

В табл. 2 представлены результаты изучения плотности связывающих сайтов для диазепама при гипотиреозе и гипертиреозе в различных областях мозга у самцов и самок крыс. Как видно из табл. 2, существенных различий в плотности диазепамсвязывающих сайтов у самок и самцов не выявлено. Как и в случае мусцимолсвязывающих сайтов, плотность бензодиазепинсвязывающих сайтов во всех изученных областях мозга при гипотиреозе повышена, а при гипертиреозе, наоборот, понижена. Так как большая часть бензодиазепиновых рецепторов находится в ГАМК<sub>A</sub>-рецепторном комплексе, это соответствие указывает, что при гипотиреозе плотность ГАМК<sub>A</sub>-рецепторов во всех областях мозга повышена, а при гипертиреозе, наоборот, понижена.

## Обсуждение

В литературе имеются противоречивые данные о влиянии экспериментального гипотиреоза и гипертиреоза на количество различных связывающих сайтов в ГАМК<sub>A</sub>-рецепторах [15]. В одних работах получены данные об уменьшении связывающих сайтов при гипотиреозе и увеличении при гипертиреозе [10]. В других доказаны прямо противоположные эффекты, т. е. увеличение при гипотиреозе и уменьшение при гипертиреозе [13]. В третьих не обнаружено никакого влияния гипотиреоза и гипертиреоза на плотность связывающих сайтов в ГАМК<sub>A</sub>-рецепторах [12, 14].

Возможно, что причина этих разногласий заключается в недостаточном отмывании препаратов

мембран. В литературе имеются указания, что в экспериментах *in vitro* трийодтиронин аллостерически увеличивает максимальное связывание для меченых бензодиазепинов к их связывающим сайтам [5]. При недостаточном отмывании синаптических мембран в них может оставаться определенное количество эндогенного трийодтиронина. Следовательно, уменьшенное количество ГАМК<sub>A</sub>-рецепторов под действием хронического введения крысам тиреоидных гормонов может в экспериментах по связыванию казаться увеличенным за счет аллостерического влияния трийодтиронина на ГАМК<sub>A</sub>-рецепторы.

Таким образом, наши эксперименты, с одной стороны, подтверждают известный факт, что одним из рецепторов для тиреоидных гормонов являются ГАМК<sub>A</sub>-рецепторные комплексы мозга, и с другой — подтверждают данные литературы о том, что при гипотиреозе плотность ГАМК<sub>A</sub>-рецепторных комплексов повышается, а при гипертиреозе, наоборот, понижается. Повышенное количество ГАМК<sub>A</sub>-рецепторных комплексов способствует преобладанию общего торможения, а пониженное способствует преобладанию общего возбуждения.

## Вывод

При экспериментальном гипотиреозе у крыс плотность ГАМК<sub>A</sub>-рецепторных комплексов в синаптосомах из мозга крыс повышена, а при гипертиреозе — понижена.

## ЛИТЕРАТУРА

- Куликов А. В., Тихонова М. А., Лебедева Е. И. и др. // Рос. физиол. журн. — 2004. — Т. 90, № 4. — С. 474–480.
- Тонких А. К., Кузнецов В. И., Каранова М. В., Садыков А. А. // Нейрохимия. — 1985. — Т. 4, № 3. — С. 260–267.
- Chude O. // J. Neurochem. — 1979. — Vol. 33. — P. 621–629.
- Costa E. // Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. — 1998. — Vol. 38. — P. 321–350.
- Dalezios Y., Matsakis N. // Neurochem. Res. — 1993. — Vol. 18, N 3. — P. 305–311.
- Iversen L. L., Bloom F. F. // Brain Res. — 1972. — Vol. 41. — P. 131–143.
- Martin J. V., Padron J. M., Newman M. A. et al. // Brain Res. — 2004. — Vol. 9, N 1–2. — P. 98–107.
- Mehta A. K., Ticku M. K. // Brain Res. Rev. — 1999. — Vol. 29, N 2–3. — P. 196–217.
- Olson W. // J. Neurochem. — 1981. — Vol. 37, N 1. — P. 1–13.
- Ortiz-Butron R., Pacheco-Rosado J., Herra-Yndez-Garcia A. et al. // Neuropharmacology. — 2003. — Vol. 44. — P. 111–116.
- Pennney J. B., Pan J. H. S., Young A. B. et al. // Science. — 1981. — Vol. 214. — P. 1036–1038.
- Roskoden T., Zilles K., Schleicher A., Schwegler H. // Neurosci. Lett. — 2002. — Vol. 333, N 1. — P. 21–24.
- Sandrini M., Marrama D., Vergoni A. V., Bertolini A. // Life Sci. — 1991. — Vol. 48, N 7. — P. 659–666.
- Sandrini M., Vergoni A. V., Bertolini A. // Pharmacol. Res. — 1993. — Vol. 28, N 1. — P. 47–52.
- Wiensa S. C., Trudeau V. L. // Comp. Biochem. Physiol. Pt A: Mol. Integrative Physiol. — 2006. — Vol. 144, N 3. — P. 332–344.

Поступила 24.02.09